Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Article
Vol. 16, No.2, 2024, p. 277-286

Expression Analysis of Candidate Genes in White and Black Spots of Skin Tissue in Lori Bakhtiari Sheep

Khadijeh Moradi[1], Mustafa Muhaghegh Dolatabady[2*], Javad Habibizad[3]

1- M.Sc. Graduate, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Yasouj, Yasouj, Iran.
2- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture Science, University of Yasouj, Yasouj, Iran.
3- Assistance Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture Science, University of Yasouj, Yasouj, Iran.
*Corresponding author: mmuhaghegh@yu.ac.ir

Received: 01-08-2023
Revised: 07-10-2023
Accepted: 18-10-2023
Available Online: 18-10-2023

How to cite this article:
Moradi, K., Muhaghegh Dolatabady, M., & Habibizad, J. (2024). Expression analysis of candidate genes in white and black spots of skin tissue in Lori Bakhtiari sheep. *Iranian Journal of Animal Science Research, 16*(2), 277-286. (in Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83699.1166

Introduction: Sheep are the main source of wool and its fiber characteristics, such as diameter, length, and color, which are determined by genetics and environmental factors, are key features in the economic value of sheep wool. In sheep, white wool has the highest economic value due to its dyeability. Therefore, identifying the mechanisms responsible for coat color determination is very important from an economic perspective.In general, the coat color is determined based on the amounts and types of melanin produced and released by the melanocytes in the skin tissue (Ito *et al*., 2000). The genetic basis and genes involved in coat color are well understood in rodents, although many of these genes are incorporated in coat color regulation in other species; including Sheep also have a common role. In Iran, the Lori Bakhtiari sheep is one of the most important breeds of sheep in terms of the use of its wool in the textile and carpet industries. In his breed, the dominant coat of the wool is white, although sometimes a percentage of dark brown and pale brown is also observed (Saadat Nouri, M. & Siah Mansour, 1368). However, in this breed, some animals have black spots on their coat, which leads to a decrease in wool quality. Since MC1R, ASIP, KLF4 and MITF genes play an important role in controlling and determining coat color in mammals, the purpose of this study was to investigate the expression of these genes in two phenotypes of white and black spots in the skin tissue of Lori Bakhtiari sheep.

Materials and Methods: Skin samples were obtained from both white and dark parts of 14 white-coated sheep with black spots and total RNA was extracted. The quality and quantity of extracted RNAs were evaluated by agarose gel electrophoresis and spectrophotometer. Extracted RNA samples were exposed to DNase1 enzyme digestion to remove the possible contamination of genomic DNA. Also, the quality of synthesized cDNA was evaluated using 1% agarose gel. In this research, in order to amplify a fragment of the studied genes, using the mRNA sequence of these genes in the GenBank database, appropriate primers were designed by Primer3plus software. To evaluate the relative expression of the target genes, β-actin and GAPDH genes were used as reference genes to normalize the data. Finally, BestKeeper and REST 2009 V2.0.13 software were used for the analysis of gene expression data.

Results and Discussion: Based on the descriptive results of Ct values, MC1R and MITF genes revealed minimum and maximum expression stability among the target genes in skin samples with standard deviations of 1.34 and 3.62, respectively. In addition, the reference genes (β-actin and GAPDH) showed the highest stability among all the studied genes. No significant differences were observed in mRNA levels of MC1R, ASIP, KLF4, and MITF genes in the spotted skin tissue compared to the white part of the skin ($p>0.05$). However, the expression of the ASIP gene was more than 2 times in the spotted part compared to the white skin, but this difference was not significant ($p=0.21$). In addition, the MC1R gene showed minimum expression differences in black spots and white parts of the skin tissue. In addition, the MITF and MC1R genes showed the highest and

https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83699.1166

lowest levels of expression in skin samples of Lori Bakhtiari breed sheep with average Ct of 25.86 and 30.42, respectively. However, among all the studied genes, the lowest mRNA level was observed for the GAPDH gene with an average Ct of 35.96.

Conclusion: Mammalian coat color results from various factors such as the degree and distribution of melanin pigment and the interaction between genotype and environment (B. Li *et al*., 2018). In addition, melanogenesis is a complex process that includes melanocyte growth, melanosome formation, melanin synthesis, melanin transport, and melanosome release (Ito & Wakamatsu, 2011). According to the conducted studies, a large number of genes are involved in the mechanism of coat color determination, but two genes, MC1R and ASIP, play an essential role in the regulation and control of coat color (Searle, 1968). In our study, no significant difference was observed in the expression of MC1R, ASIP, KFL4, and MITF genes in the spotted compared to the white part of the skin tissue in Lori Bakhtiari sheep. These results showed that the development of skin spots is not under the control of the studied genes in Lori Bakhtiari sheep, and genes or other factors can play roles in the creation of dark spots in this breed.

Keywords: Black spot, Coat color, Gene expression, Sheep

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران

Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۲۸۶-۲۷۷

تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های کاندیدا در بخش‌های سفید و تیره بافت پوست در گوسفند لری بختیاری

خدیجه مرادی[1]، مصطفی محقق دولت آبادی[2*]، جواد حبیبی زاد[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۱۰

تاریخ بازنگری:۱۴۰۲/۰۷/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۶

چکیده

در گوسفندان نژاد لری بختیاری، وجود لکه‌های سیاه بر روی پوست منجر به کاهش کیفیت پشم استحصالی می‌شود. اساس مولکولی و ژن‌های دخیل در رنگ پوشش برخی از دام‌ها از جمله گوسفندان تا حدودی شناسایی شده است. از این رو، هدف از انجام این مطالعه، بررسی بیان ژن‌های گیرنده ملانوکورتین-۱ (MC1R)، پروتئین سیگنال‌دهی آگوتی (ASIP)، فاکتور شبه‌کروپل۴ (KLF4)، و فاکتور رونویسی القاکننده ملانوسیت (MITF) در بخش‌های سفید و تیره بافت پوست در گوسفندان نژاد لری بختیاری بود. برای این منظور، از تعداد ۱۴ رأس گوسفند با رنگ پوشش سفید دارای لکه‌های تیره (سیاه)، نمونه پوست از هر دو بخش سفید و تیره تهیه و RNA کل استخراج گردید. برای ارزیابی بیان نسبی ژن‌های مورد نظر، از ژن‌های β-actin و GAPDH به‌عنوان ژن مرجع جهت نرمال کردن داده‌ها استفاده گردید. همچنین، جهت تکثیر قطعه‌ای از ژن‌های مورد مطالعه، با استفاده از توالی mRNA موجود برای این ژن‌ها در بانک اطلاعاتی (GenBank)، آغازگرهای مناسب توسط نرم‌افزار Primer3plus طراحی شدند. در نهایت، از نرم‌افزارهای BestKeeper و REST 2009 V2.0.13 برای تجزیه و تحلیل داده‌های بیان ژن استفاده شد. بر اساس نتایج توصیفی، ژن‌های MC1R وMITF با میانگین ۳۰/۴۲ و ۲۵/۸۶ برای مقادیر Ct، به‌ترتیب کمترین و بیشترین مقدار بیان را در بین ژن‌های هدف در نمونه‌های پوستی داشتند. علاوه‌براین، ژن‌های مرجع (β-actin و GAPDH) بیشترین پایداری بیان را در بین تمام ژن‌های مورد مطالعه داشتند. تفاوت معنی‌داری در سطوح mRNA ژن‌های MC1R، ASIP، KLF4 و MITF در بافت تیره پوست نسبت به بخش سفید پوست مشاهده نشد. اگرچه، بیان ژن ASIP در قسمت تیره نسبت به بخش سفید پوست بیش از دو برابر بود، امّا این تفاوت ازنظر آماری معنی‌دار نبود. علاوه‌براین، ژن MC1R کمترین تفاوت بیان را در بخش‌های سیاه و سفید بافت پوست از خود نشان داد. این نتایج نشان می دهد که سطح بیان این چهار ژن مورد مطالعه نقشی در ایجاد لکه‌های پوستی سیاه رنگ در گوسفند نژاد لری بختیاری نداشته باشد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، رنگ پوشش، گوسفند، لکه سیاه پوست

مقدمه

گوسفندان، مهم‌ترین حیوانات تولیدکننده الیاف در سراسر جهان هستند. قطر، طول و رنگ الیاف از ویژگی‌های کلیدی در ارزش اقتصادی گوسفندان است که توسط ژنتیک و محیط تعیین می‌شود. به‌طور کلی، فاکتورهای تعیین‌کننده رنگ پوشش از نظر اقتصادی از اهمیت به‌سزایی برخوردار هستند. در ایران، یکی از نژادهای مهم گوسفند از نظر کاربرد پشم آن در صنایع نساجی و قالیبافی، گوسفند نژاد لری بختیاری می‌باشد. پوشش غالب پشم این نژاد رنگ سفید می‌باشد، البته گاهی درصدی قهوه‌ای تیره (قنقر) و قهوه‌ای کم‌رنگ نیز مشاهده می‌شود. علاوه‌براین، برخی از گوسفندان این نژاد دارای لکه‌هایی بر روی پوشش خود هستند که از نظر رنگ می‌تواند قهوه‌ای تیره و یا روشن، و در مواردی کم لکه سیاه باشد (Saadat Nouri and Siah Mansour, 1368)، که وجود این لکه‌ها منجر به کاهش کیفیت پشم استحصالی می‌شود. به‌طور کلی، در گوسفند، پشم سفید به‌دلیل توانایی رنگ‌پذیری دارای بالاترین ارزش اقتصادی بوده، در حالی که علاقه به رنگ‌های طبیعی به‌دلیل انقلاب سبز و ترجیح مصرف‌کننده به محصولات طبیعی در حال افزایش است. رنگ پوشش بر اساس مقادیر و انواع ملانین تولید شده و آزاد شده توسط

۱- کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران.

۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران.

(*- نویسنده مسئول: Email: mmuhaghegh@yu.ac.ir)

https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83699.1166

ملانوسیت‌های موجود در پوست تعیین می‌شود (Ito and Wakamatsu, 2008; Ito et al., 2000). اساس ژنتیکی و ژن‌های دخیل در رنگ پوشش جوندگان به‌خوبی شناسایی شده است (Slominski et al., 2004; Steingrímsson et al., 2006)، البته بسیاری از این ژن‌ها در تنظیم رنگ پوشش در گونه‌های دیگر، از جمله گوسفندان نیز نقش مشترکی دارند. به‌عنوان مثال، ژن‌های گیرنده ملانوکورتین-۱[1] (MC1R)، پروتئین سیگنال‌دهی آگوتی[2] (ASIP)، به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی رنگ پوشش در موش‌ها شناخته می‌شوند و در گوسفند نیز، ژنوتیپ‌های این ژن‌ها از نظر عملکرد با فنوتیپ‌های متفاوت رنگ پوشش در ارتباط هستند (Gratten et al., 2007; Norris and Whan, 2008; Våge et al., 1999). با وجود دانش قابل توجه در مورد تنظیم ژنتیکی رنگ پوشش در موش‌ها و شناسایی ژن‌های دخیل در تنظیم رنگ پوشش در گونه‌های تولیدکننده الیاف، تاکنون سازوکارهای مولکولی در سطح بیان ژن، مرتبط با تفاوت‌ها در فنوتیپ رنگ پوشش به‌خوبی شناخته نشده است. این اطلاعات نه تنها به‌منظور افزایش درک اساسی از تنظیم ملانوژنز، بلکه برای شناسایی رویکردهای جدید دارویی و روش‌های ژنتیک مولکولی جهت تنظیم یا انتخاب رنگ پوشش در گونه‌های تولیدکننده الیاف ضروری می‌باشد. از این رو، پروفایل رونویسی یک رویکرد قدرتمند برای شناسایی ژن‌های بیان شده در سطح کلی و عملکردی در بافت‌های مختلف از جمله پوست محسوب می‌شود (Kim et al., 2006). در مطالعات اولیه در گوسفند، به‌منظور درک سازوکارهای مولکولی دخیل در تشکیل رنگ پوشش، از تولید برچسب‌های توالی بیان شده[3] (EST) پوست گوسفند و تکنیک تعیین توالی استفاده می‌شد (Fan et al., 2011; Hu et al., 2009). سپس، با استفاده از فناوری ریزآرایه، تفاوت بیان ژن‌های مرتبط با لکه‌های سیاه پوست در گوسفندان از جمله نژاد کوریدال بررسی شدند (Peñagaricano et al., 2012). امروزه، معمولاً جهت بررسی ژن-های مؤثر در رنگ پوشش گوسفند، به‌ویژه در الیاف و رنگدانه‌های پوشش، از تکنیک RNA-seq استفاده می‌شود. در حال حاضر، اطلاعات محدودی در مورد تفاوت در پروفایل رونویسی پوست مرتبط با رنگ پوشش در گونه‌های مختلف پستانداران در دسترس است. برای بررسی ژن‌هایی که ممکن است نقش مهمی در تنظیم رنگ پوشش در پوست گوسفندان داشته و همچنین افزایش اطلاعات در مورد سازوکارهای مولکولی مسئول بیوشیمی پوست و الیاف (از جمله رنگدانه‌سازی) در حیوانات تولیدکننده پشم مانند گوسفند، بررسی پروفایل رونویسی در پوست گوسفندان با رنگ پوشش سیاه و سفید، می‌تواند اطلاعات بسیار مهمی فراهم کند. نتایج این مطالعات، بینش جدیدی را در مورد تفاوت بیان ژن‌های مرتبط با رنگ پوشش، از جمله ژن‌های کلیدی دخیل در مسیر ملانوژنز را در دسترس قرار می-دهد. در مطالعه‌ای بر اساس روش RNA-seq، تعداد ۳۷۷۶۸ ژن بیان شده در پوست گوسفند شناسایی شدند که از این بین، میزان بیان تعداد ۲۲۳۵ ژن در بخش‌های سیاه و سفید گوسفند متفاوت بودند. از این تعداد، ژن شناسایی شده با بیان متفاوت، MC1R، ASIP، DCT، TYR، TYRP1 و MATP مهم‌ترین ژن‌هایی بودند که بیان آن‌ها در بخش‌های سیاه و سفید پوست گوسفند از نظر آماری تفاوت معنی‌داری داشتند (Fan et al., 2013). از آنجایی که ژن‌های MC1R، ASIP، KLF4 و MITF نقش مهمی در کنترل و تعیین رنگ پوشش در پستانداران بر عهده دارند، هدف از انجام این مطالعه، بررسی بیان این ژن‌ها در بخش‌های سفید و تیره پوست در گوسفندان نژاد لری بختیاری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، نمونه‌های پوست از کشتارگاه دام شهر یاسوج و از حیوانات بالغ نژاد لری بختیاری تهیه گردید تا تغییرات مربوط به سن کاهش یابد. تعداد ۱۴ راس گوسفند نژاد لری بختیاری قبل از کشتار علامت‌گذاری شدند تا بلافاصله پس از کشتار فرآیند نمونه‌برداری بر روی آن‌ها صورت گیرد، به‌طوری‌که از هر گوسفند، یک نمونه از قسمت سفید پوست و یک نمونه از قسمت لکه‌های موجود برداشته شد. پس از نمونه‌گیری، نمونه‌ها با سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند و بلافاصله به تانک ازت منتقل گردیدند. استخراج RNA از ۵۰ میکروگرم بافت پوست طبق دستورالعمل کیت استخراج Total RNA (شرکت آزما ژن) انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه اسپکتروفوتومتر ارزیابی گردید. برای حذف آلودگی احتمالی DNA ژنومی، نمونه‌های RNA استخراجی در معرض هضم آنزیم DNase1 قرار گرفتند. برای سنتز cDNA از کیت شرکت یکتا تجهیز آزما استفاده شد. همچنین، کیفیت cDNA سنتز شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد ارزیابی شدند. در این تحقیق، جهت تکثیر قطعه‌ای از ژن‌های مورد مطالعه، با استفاده از توالی mRNA این ژن‌ها در بانک اطلاعاتی GenBank، آغازگرهای مناسب توسط نرم‌افزار Primer3plus طراحی شدند (جدول ۱). در روش تعیین کمّی بیان ژن، تصحیح تغییرات آزمایشی ضروری است. برای این منظور، از دو ژن کنترل داخلی β-actin و GAPDH به‌عنوان ژن‌های مرجع جهت نرمالیزه کردن داده‌ها استفاده شد. اندازه‌گیری بیان ژن‌ها طی واکنش Real Time PCR در دستگاه Bio Rad مدل CFX 96 و با استفاده از رنگ فلورسنت سایبرگرین بر پایه روش استاندارد نسبی صورت گرفت. برای واکنش

1-Melanocortin 1 receptor (MC1R)
2- Agouti signaling protein (ASIP)
3-Expressed sequence tag (EST)

Real Time PCR از مستر میکس سایبرگرین امپلیکون فراهم شده توسط شرکت آزماژن استفاده شد. برای این منظور، برای هر نمونه در هر میکروتیوب، مقدار پنج میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین، یک میکرولیتر آغازگر رفت با غلظت پنج پیکومول، یک میکرولیتر آغازگر برگشت با غلظت پنج پیکومول، یک میکرولیتر cDNA سنتز شده (۵۰ نانوگرم) و دو میکرولیتر آب عاری از DNase اضافه شد که در کل حجم نهایی هر واکنش به ۱۰ میکرولیتر رسید. همچنین، برای کاهش خطا برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. برنامه حرارتی مورد استفاده در واکنش Real Time PCR برای ژن‌های مورد مطالعه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه،۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه بود که دو مرحله آخر، ۴۰ بار تکرار شدند. همچنین، بلافاصله پس از آخرین چرخه تکثیر، تجزیه و تحلیل منحنی ذوب شروع شد که این فرآیند شامل افزایش دما از ۶۵ درجه سانتی‌گراد به ۹۵ درجه سانتی‌گراد با افزایش ۰/۵ درجه سانتی‌گراد در هر مرحله بود. در روش Real Time PCR، تکثیر قطعه مورد نظر با تجمع یک سیگنال فلورسنت تشخیص داده می‌شود. مقدار Ct یا چرخه آستانه به‌عنوان تعداد چرخه‌های مورد نیاز برای عبور سیگنال فلورسنت از آستانه (یعنی فراتر از سطح پس زمینه) تعریف می‌شود. در انتهای واکنش RT-PCR، نرم‌افزار دستگاه به‌طور خودکار خط آستانه را رسم و نتایج را به‌صورت چرخه آستانه (Ct) گزارش می‌کند. آمار توصیفی داده‌ها با استفاده از Ctهای به‌دست آمده برای هر ژن سیتوکین توسط برنامه BestKeeper بررسی شدند. نتایج Real-time PCR با برنامه REST, 2009, V2.0.13 برای مقایسه تفاوت بیان ژن‌ها در دو بخش سفید و تیره پوست مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نرم‌افزار REST یک نرم‌افزاری است که قادر است دو گروه با بیش از ۱۶ نقطه‌ی اطلاعاتی در یک نمونه و ۱۶ نقطه در یک گروه کنترل برای ژن مرجع را مقایسه کند (Pfaffl *et al*., 2002).

جدول ۱- ویژگی‌های آغازگرهای ژن‌های هدف و مرجع

Table 1- Primers characteristics of target and references genes

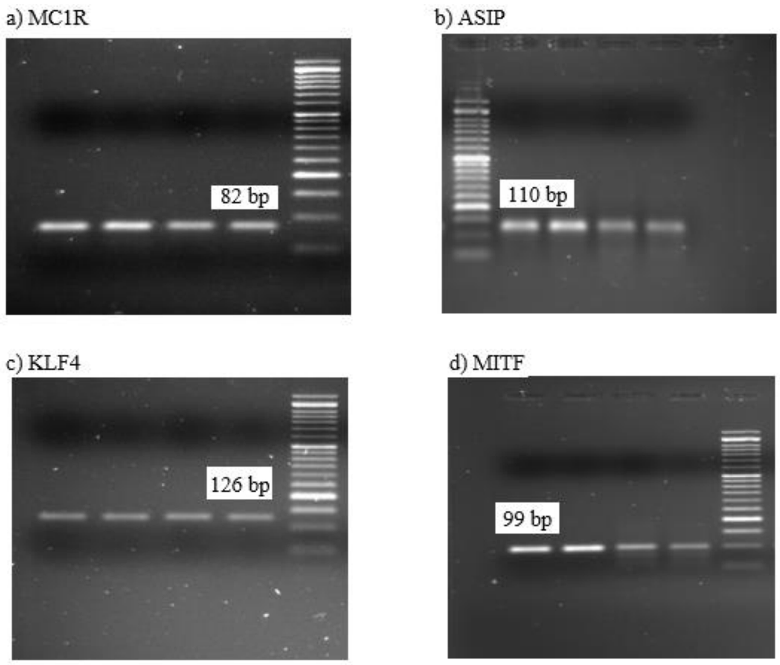
ژن Gene	توالی Sequence	طول قطعه (جفت باز) Length (bp)	شماره دسترسی Accession number
MC1R	F: 5’- CAATCGGACAGGGCCCCAGTGC -3’ R: 5’- TGAGGGCCAGGAAGAGGTTGAAGT -3’	82	NM_001282528.1
ASIP	F: 5’-GATTTCCCTTCTGTCTCTATCGTGG-3’ R: 5’-TTCTTCATCGGAGCCTTTCTCTTG-3’	110	NM_001134303.1
KLF4	F: 5’-CGACCTGGAGAGTGGAGGAG-3’ R: 5’-GACAGCGAGTTGGAGAGGATAAAG-3’	126	NM_001164219
MITF	F: 5’-ATGGACGATACCCTTTCTCCTGTTG-3’ R: 5’-GCTCATACTGCTCCTTCGGCT-3’	99	JN208147.1
β-actin	F: 5’- CAATGTGGCCGAGGACTTTGAC-3’ R: 5’- CTTAGAGAGAAGGAGGGTGGCTTT-3’	125	NM_001009784.3
GAPDH	F: 5’- AGGAGCACGAGAGGAAGAGAGAG-3’ R: 5’- GATGGAAATGTATGGAGGTCGGGAG-3’	96	NM_001190390.1

نتایج و بحث

جهت تأیید اندازه قطعات تکثیر شده، محصولات روی ژل آگارز یک درصد همراه با نشانگر ۵۰ جفت باز الکتروفورز شدند (شکل ۱). اندازه قطعات تکثیر شده برای ژن‌های MC1R، ASIP، KLF4 و MITF به‌ترتیب ۸۲، ۱۱۰، ۱۲۶ و ۹۹ جفت باز بود که بیانگر صحت قطعات تکثیر یافته برای هر ژن است. داده‌های توصیفی حاصل از نرم‌افزار BestKeeper برای مقادیر Ct ژن‌های هدف و مرجع در جدول ۲ آمده است. یکی از مهم‌ترین اطلاعات این جدول، مقادیر انحراف معیار برای داده‌های Ct هر ژن است، به‌طوری‌که در بین ژن-های هدف دو ژن MC1R و MITF به‌ترتیب با انحراف معیارهای ۱/۳۴ و ۳/۶۲ دارای حداقل و حداکثر پراکندگی بیان در نمونه‌های پوست بودند. از آنجایی که در ژن‌های مرجع، هر چه پایداری ژن در نمونه‌های کنترل و تیمار بیشتر باشد، ژن مناسب‌تری برای نرمال کردن مقادیر Ct محسوب می‌شود، بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، هردو ژن β-actin و GAPDH دارای بالاترین پایداری در بین همه ژن‌های مورد بودند (شکل ۲).

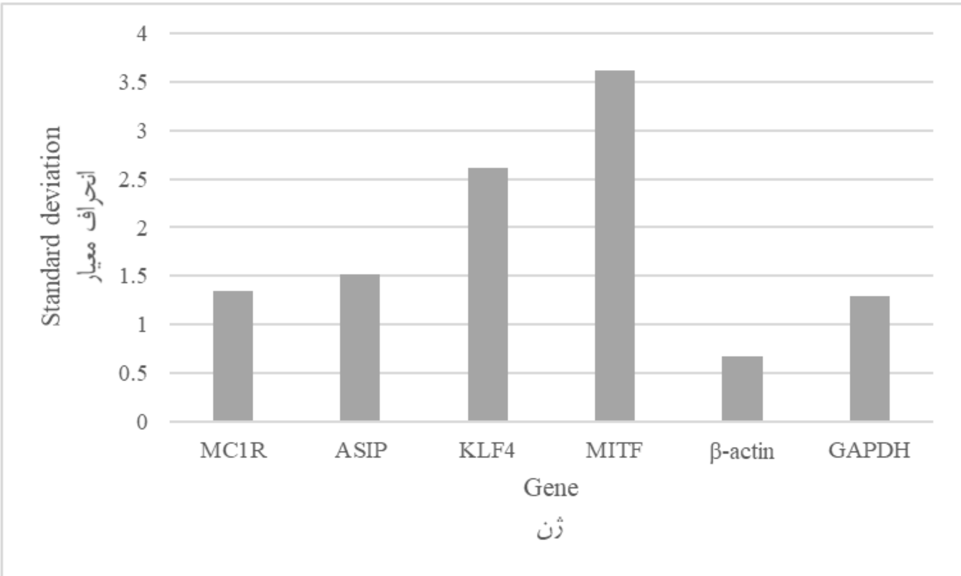
از آنجایی که مقدار چرخه آستانه (Ct) رابطه معکوسی با سطح بیان نسبی ژن در بافت مورد نظر دارد، ژن‌های MITF و MC1R به‌ترتیب با میانگین چرخه آستانه ۲۵/۸۶ و ۳۰/۴۲ دارای بیشترین و کمترین میزان بیان در نمونه‌های پوست گوسفند نژاد لری بختیاری بودند. البته، در بین تمام ژن‌های مورد مطالعه، ژن GAPDH با میانگین چرخه آستانه ۳۵/۹۶ کمترین میزان بیان در نمونه‌های پوست را نشان داد. میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در بخش‌های تیره و سفید پوست در شکل ۳ آمده است. همان‌طور که در شکل مشخص شده، ژن‌های ASIP و MC1R به‌ترتیب دارای حداکثر و حداقل تفاوت بیان در بخش سیاه نسبت به بخش سفید پوست را دارا می-

باشند. البته از نظر آماری تفاوت بیان ژن‌های مـورد مطالعـه در بافـت تیره نسبت به بافت سفید پوست در گوسـفندان نـژاد لـری بختیـاری معنی‌دار نبود (p>0.05)، به‌طوری‌کـه مقـادیر p بـرای مقایسـه بیـان ژن‌های MC1R، ASIP، KLF4 و MITF در قسمت تیره نسبت به بخش سفید پوست به‌ترتیب ۰/۸۳، ۰/۲۱، ۰/۷۶ و ۰/۶۰ بودند.



شکل ۱– قطعات تکثیر شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به‌همراه نشانگر ۵۰ جفت باز

Figure 1– Amplified fragments using specific primers along with 50 bp ladder



شکل ۲– میزان پراکندگی بیان ژن‌های مورد مطالعه در نمونه‌های پوستی بر اساس انحراف معیار

Figure 2- The expression distribution of the studied genes in skin samples based on standard deviation (SD)

رنگ پوشش پستانداران محصول چندین عامل از جملـه درجـه و توزیع رنگدانه ملانین و همچنین بـرهم‌کنش بـین ژنوتیـپ و محـیط است (Li *et al*., 2018). علاوه‌براین، ملانوژنز فرآیندی پیچیده بوده که شامل رشد ملانوسیت، تشکیل ملانـوزوم، سـنتز ملانـین، انتقـال ملانـین و آزادسـازی ملانـوزوم مـی‌باشـد (Ito and Wakamatsu, 2011). بر اساس مطالعات انجام شده، تعـداد زیـادی ژن در سـازوکار

تعیین رنگ پوشش دخالت دارند، ولی دو ژن MC1R و ASIP نقش اساسی در تنظیم وکنترل رنگ پوشش بر عهده دارند (Searle, 1968). علاوه‌بر این دو ژن، ژن‌های دیگری مانند فاکتور رونویسی القاکننده ملانوسیت (MITF) و فاکتور شبه کروپل ۴ (KLF4)، در تعیین رنگ پوشش نقش مؤثری دارند (Bellei *et al.*, 2012). به‌طور کلی در پستانداران، نوع رنگدانه تولید شده و رنگ پوشش توسط سیگنال رسانی MC1R کنترل می‌شود. در این فرآیند، MC1R به دو لیگاند α-MSH و ASIP پاسخ می‌دهد. α-MSH به‌عنوان آگونیست MC1R با افزایش سطح cAMP داخل سلولی و فعال کردن فاکتورهای رونویسی مختلف از جمله فاکتور رونویسی MITF، منجر به تشکیل یوملانین می‌شود (Levy *et al.*, 2006).

از طرف دیگر، تعامل MC1R با ASIP با کاهش سطح cAMP باعث تولید فوملانین در سلول خواهد شد. در ملانوزوم‌ها نیز، بیان ژن‌های مرتبط با رنگدانه به‌طور خاص پروتئین‌های ۱ و ۲ مرتبط به تیروزیناز (TRP1 و TRP2) توسط فاکتور رونویسی MITF تنظیم می‌شوند (Bellei *et al.*, 2012). همچنین، فاکتور شبه کروپل۴ (KLF4) یک فاکتور رونویسی می‌باشد که در سلول‌های تمایز یافته نهایی روده و پوست بیان می‌شود (Segre *et al.*, 1999). این فاکتور در تمایز سلول‌های اپیتلیال (Chen *et al.*, 2020)، برنامه‌ریزی مجدد فیبروبلاست‌ها (Takahashi *et al.*, 2007) و ملانوسیت‌ها نقش اساسی دارد (Utikal *et al.*, 2009).

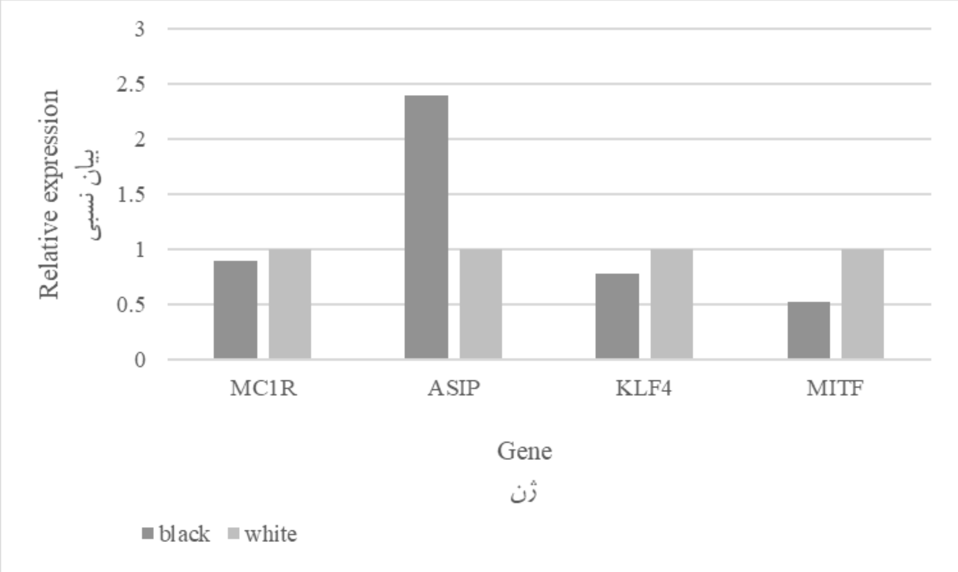
جدول ۲– آمار توصیفی مقادیر Ct برای ژن‌های مورد مطالعه

Table 2- Descriptive statistics of Ct values for the studied genes

	MC1R	ASIP	KLF4	MITF	β-actin	GAPDH
تعداد N	28	28	28	28	28	28
میانگین جغرافیایی [Ct] Geo Mean [Ct]	30.35	27.76	28.80	25.52	29.81	35.92
میانگین حسابی [Ct] Ar Mean [Ct]	30.42	27.85	28.97	25.86	29.82	35.96
حداقل [Ct] Min [Ct]	24.66	20.07	22.32	19.13	27.18	32.17
حداکثر [Ct] Max [Ct]	32.06	30.95	34.82	30.99	31.01	39.63
انحراف معیار [± Ct] Std dev [± Ct]	1.34	1.52	2.61	3.62	0.67	1.29
ضریب تغییر [% Ct] CV [% Ct]	4.41	5.47	9.02	14.00	2.24	3.59

در این مطالعه، بیان چهار ژن (MC1R، ASIP، KFL4 و MITF) دخیل در تعیین رنگ پوشش، در بخش تیره پوست نسبت به بافت سفید پوست در گوسفند نژاد لری بختیاری تفاوت معنی‌داری از خود نشان نداد. مطالعات متعددی ارتباط بیان ژن‌های مرتبط با رنگ پوشش در دام‌های متفاوت اهلی را بررسی و گزارش کرده‌اند. برای مثال، در مطالعه‌ای در گوسفند قزاقستانی، سطح بیان MC1R در پوست سیاه به‌طور قابل توجهی با موهای سفید و موهای قهوه‌ای متفاوت بود، در حالی که بیان ژن ASIP با موهای با رنگ مختلف ارتباطی نداشت (Li *et al.*, 2013)، در مطالعه دیگری بر روی گوسفند زالدا، نتایج متناقضی در بررسی تفاوت بیان ژن ASIP در گوسفندان با پوشش سیاه رنگ و سفید مشاهده شد، به‌طوری‌که سطح بیان ASIP در گوسفند نژاد زالدا با رنگ پوشش سیاه به‌طور قابل توجهی کمتر از سطوح ارزیابی شده در پوشش سفید رنگ بود (Royo *et al.*, 2008).

در مطالعه‌ای بر روی گوسفند مرینوس، تغییر در سطح بیان ژن ASIP منجر به ایجاد فنوتیپ‌های سفید غالب و یا سیاه مغلوب می‌شود (Norris and Whan, 2008). در تحقیق انجام شده بر روی گوسفند تبتی، هر دو سطح mRNA و پروتئین MITF در هر دو بافت پوست سیاه و بافت لکه سیاه در مقایسه با بافت سفید رنگ پوست به‌طور قابل توجهی بالاتر بود. علاوه‌براین، بیان mRNA و پروتئین KIT بین بافت پوست سفید و سیاه متفاوت بود (Han *et al.*, 2015). تفاوت معنی‌داری در بیان ژن‌های ASIP، MC1R و C-KIT، بین بخش سفید و تیره پوست در گوسفند کوریدال مشاهده نشد. البته، ژن‌های C-FOS، KLF4 و UFC1، بیان متفاوتی را در بخش سیاه از خود نشان دادند که بیانگر نقش احتمالی آن‌ها در ایجاد لکه‌های سیاه در پوست گوسفند کوریدال می‌باشد (Peñagaricano *et al.*, 2012).



شکل ۳- بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در بخش لکه دار و سفید پوست

Figure 3- The relative expression of the studied genes in the spotted and white part of the skin

با استفاده از فناوری تراشه ژنی مشخص گردید که سطوح بیانی ژن KLF4 در پوست تیره به‌طور قابل‌توجهی بالاتر از پوست روشن در گوسفند نژاد کوریدال است (Peñagaricano *et al.*, 2012) که نشان می‌دهد این ژن با تشکیل رنگدانه مرتبط بوده، ولی عملکرد آن ناشناخته است. همچنین، بیان متفاوت KLF4 در سطوح RNA و پروتئین در رنگ‌های مختلف پوشش گوسفند گزارش شد (Qin *et al.*, 2022). در این مطالعه با تیره شدن رنگ پوشش، بیان mRNA ژن KLF4 افزایش یافت و سطح پروتئین KLF4 نیز روند مشابهی را نشان داد، به‌طوری‌که نمونه‌های پوست گوسفند با پوشش سیاه حاوی بالاترین سطح KLF4 بودند (Qin *et al.*, 2022). بیان متفاوتی از ژن‌های SLC45A2 و GPR143 در پوست گوسفند با رنگ‌های مختلف پوشش گزارش شده است (Chen *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). ژن GPR143 یک گیرنده جفت شده با پروتئین G اختصاصی، رنگدانه، GPCR را کد می‌کند که به‌صورت درون سلولی در ملانوزوم‌ها قرار دارد، جایی که بیوژنز ملانوزوم و اندازه اندامک‌ها را در سلول‌های رنگدانه تنظیم می‌کند (De Filippo *et al.*, 2017). ژن SLC45A2 پروتئین ناقل مرتبط با غشا (MATP) را کد می‌کند که سنتز ملانین را از طریق انتقال تیروزیناز و انتقال پروتون به ملانوزوم‌ها تعدیل می‌کند (de Aguiar *et al.*, 2017). در مطالعه رنگ پوشش در بزهای پشمینا، افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های ASIP، KIT، KITLG و MITF در بخش سفید پوست گزارش گردید. همچنین، بیان ژن ASIP در رنگ پوشش سفید و قهوه‌ای بزهای پشمینا در مقایسه با رنگ پوشش سیاه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. از طرف دیگر، در این مطالعه، بیان α-MSH و MC1R در رنگ‌های مختلف پوشش از نظر آماری تفاوت معنی‌دار نداشتند (Bhat *et al.*, 2019). علاوه‌بر تفاوت در میزان بیان ژن‌های دخیل در تعیین رنگ پوشش، جهش در این ژن‌ها نیز می‌تواند مکانیسمی در تفاوت رنگ پوشش قلمداد گردد. برای مثال، جهش‌های عملکردی ژن MC1R که باعث ایجاد تنوع در رنگ پوشش می‌شود، در حیوانات اهلی، مانند گوسفند (Våge *et* Fontanesi *et al.*, 2011; *al.*, 1999) و بز (Fontanesi *et al.*, 2009) توصیف شده است. در مطالعه‌ای بر روی چندین گوسفند نژاد غرب آفریقا، برای چگونگی انتقال لکه‌های تیره به نسل آینده، میزان مشارکت آلل‌های ژن‌های MC1R و ASIP در هر فنوتیپ مشخص شد و چنین نتیجه‌گیری شد که آلل E^D ژن MC1R عامل رنگ تیره بوده و در حیوانات با رنگ سفید آلل وحشی این ژن وجود دارد. به همین دلیل، لکه‌داری این نژاد به‌طور جزئی به ژن MC1R نسبت داده می‌شود (Traoré *et al.*, 2012). در نژاد گوسفند پرامنکا مشخص شده است که فقدان آلل غالب ژن ASIP منجر به ایجاد یک فنوتیپ کاملاً سیاه می‌شود، در حالی که در حضور یک نسخه آلل از این ژن فنوتیپ سفید مشاهده خواهد شد (Fontanesi *et al.*, 2011).

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی، شناسایی ژن‌های دخیل در ایجاد لکه‌های تیره پوست در گوسفند امکان تشخیص مکانیسم‌های مولکولی دخیل در این فرآیند را فراهم کرده و از این رو، درک بیولوژی ملانوسیت و رنگدانه‌های پوست افزایش می‌یابد. در گوسفند، درک این پدیده اولین

قدم به‌سمت توسعه و استفاده از ابزارهای مولکولی بـرای کمـک بـه انتخاب در برابر حضور الیاف رنگی در پشـم سـفید اسـت. در مطالعـه حاضر، مقایسه بیـان ژن‌هـای MC1R، ASIP، KFL4 و MITF در بخش تیره پوست گوسفندان لری بختیاری نسـبت بـه بخـش سـفید پوست تفاوت معنی‌داری مشاهده نشـد. اگرچـه ژن ASIP در بخـش تیره در مقایسه با بخش سفید پوست، بیانی بیش از دو برابری داشت، ولی این اختلاف معنی‌دار نبود (p=0.21). این نتایج نشان می‌دهد که ایجاد لکه‌های پوست در گوسفند لـری بختیـاری در کنتـرل ژن‌هـای مورد مطالعه نبوده و ژن‌ها و یا عوامل دیگری می‌توانند در ایجاد ایـن لکه‌ها نقش داشته باشند که شناسایی آن‌ها نیازمند مطالعات بیشـتری است.

References

1. Bellei, B., Pitisci, A., Izzo, E., & Picardo, M. (2012). Inhibition of melanogenesis by the pyridinyl imidazole class of compounds: Possible involvement of the Wnt/β-catenin signaling pathway. *PLoS One*, *7*(3), e33021. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033021
2. Bhat, B., Singh, A., Iqbal, Z., Kaushik, J. K., Rao, A., Ahmad, S. M., Bhat, H., Ayaz, A., Sheikh, F.D., Kalra, S., & Kalra, S. (2019). Comparative transcriptome analysis reveals the genetic basis of coat color variation in Pashmina goat. *Scientific Reports*, *9*(1), 6361. https://doi.org/10.1038/s41598-019-42676-y
3. Chen, T., Zhao, B., Liu, Y., Zhao, Y., Wang, H., Fan, R., Wang, P., & Dong, C. (2016). Expression and localization of GPR143 in sheep skin. *Yi Chuan= Hereditas*, *38*(7), 658-665. https://doi.org/10.16288/j.yczz.16-068
4. Chen, Z., Gao, Y., Gao, S., Song, D., & Feng, Y. (2020). MiR-135b-5p promotes viability, proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by targeting Krüppel-like factor 4 (KLF4). *Archives of Medical Science*, *16*(1), 167-176. https://doi.org/10.5114/aoms.2019.87761
5. de Aguiar Fracasso, N. C., de Andrade, E. S., Wiezel, C. E. V., Andrade, C. C. F., Zanao, L. R., da Silva, M. S., Marano, L. A., Donadi, E. A., Castelli, E. C., Simoes, A. L., & Simoes, A. L. (2017). Haplotypes from the SLC45A2 gene are associated with the presence of freckles and eye, hair and skin pigmentation in Brazil. *Legal Medicine*, *25*, 43-51. https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2016.12.013
6. De Filippo, E., Manga, P., & Schiedel, A. C. (2017). Identification of novel G protein–coupled receptor 143 ligands as pharmacologic tools for investigating X-linked ocular albinism. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *58*(7), 3118-3126. https://doi.org/10.1167/iovs.16-21128
7. Fan, R., Dong, Y., Cao, J., Bai, R., Zhu, Z., Li, P., Zhang, J., He, X., Lü, L., Yao, J., & Yao, J. (2011). Gene expression profile in white alpaca (*Vicugna pacos*) skin. *Animal*, *5*(8), 1157-1161. https://doi.org/10.1017/S1751731111000280
8. Fan, R., Xie, J., Bai, J., Wang, H., Tian, X., Bai, R., Jia, X., Yang, L., Song, Y., Herrid, M., & Herrid, M. (2013). Skin transcriptome profiles associated with coat color in sheep. *BMC Genomics*, *14*(1), 1-12. http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/389
9. Fontanesi, L., Beretti, F., Riggio, V., Dall'Olio, S., González, E. G., Finocchiaro, R., Davoli, R., Russo, V., & Portolano, B. (2009). Missense and nonsense mutations in melanocortin 1 receptor (MC1R) gene of different goat breeds: Association with red and black coat colour phenotypes but with unexpected evidences. *BMC Genetics*, *10*(1), 1-12. https://bmcgenomdata.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2156-10-47
10. Fontanesi, L., Dall'Olio, S., Beretti, F., Portolano, B., & Russo, V. (2011). Coat colours in the Massese sheep breed are associated with mutations in the agouti signalling protein (ASIP) and melanocortin 1 receptor (MC1R) genes. *Animal*, *5*(1), 8-17. https://doi.org/10.1017/S1751731110001382
11. Gratten, J., Beraldi, D., Lowder, B., McRae, A., Visscher, P., Pemberton, J., & Slate, J. (2007). Compelling evidence that a single nucleotide substitution in TYRP1 is responsible for coat-colour polymorphism in a free-living population of Soay sheep. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *274*(1610), 619-626. https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3762
12. Han, J. L., Min, Y., Guo, T. T., Yue, Y. J., Liu, J. B., Niu, C. E., Wang, C. F., & Yang, B. H. (2015). Molecular characterization of two candidate genes associated with coat color in Tibetan sheep (Ovis arise). *Journal of Integrative Agriculture*, *14*(7), 1390-1397. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60928-X
13. Hu, X., Gao, Y., Feng, C., Liu, Q., Wang, X., Du, Z., Wang, Q., & Li, N. (2009). Advanced technologies for genomic analysis in farm animals and its application for QTL mapping. *Genetica*, *136*(2), 371-386. https://doi.org/10.1007/s10709-008-9338-7
14. Ito, S., & Wakamatsu, K. (2008). Chemistry of mixed melanogenesis-pivotal roles of dopaquinone. photochemistry and photobiology, *84*(3), 582-592. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00238.x
15. Ito, S., & Wakamatsu, K. (2011). Human hair melanins: What we have learned and have not learned from mouse coat color pigmentation. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *24*(1), 63-74. https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00755.x

16. Ito, S., Wakamatsu, K., & Ozeki, H. (2000). Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. *Pigment Cell Research, 13*, 103-109. https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.13.s8.19.x
17. Kim, T. H., Kim, N. S., Lim, D., Lee, K. T., Oh, J. H., Park, H. S., Jang, G. W., Kim, H. Y., Jeon, M., Choi, B. H., & Choi, B. H. (2006). Generation and analysis of large-scale expressed sequence tags (ESTs) from a full-length enriched cDNA library of porcine backfat tissue. *BMC Genomics, 7*(1), 1-9. https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-36
18. Levy, C., Khaled, M., & Fisher, D. E. (2006). MITF: Master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in Molecular Medicine, 12*(9), 406-414. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.07.008
19. Li, B., He, X., Zhao, Y., Bai, D., Shiraigo, W., Zhao, Q., & Manglai, D. (2018). Regulatory pathway analysis of coat color genes in Mongolian horses. *Hereditas, 155*, 1-10. https://doi.org/10.1186/s41065-017-0048-y
20. Li, H., Zeng, X., Zhang, W., Zhao, H., Hui, W., Liu, G., Luo, Y., Ban, Q., Zhao, Z. S., & Jia, B. (2013). Analysis of the relationship between polymorphism/mRNA expression levels of MC1R and ASIP and coat color phenotype in Kazakh sheep. *Acta Vet Et Zootech Sin*, *44*(3), 366-375. http://www.xmsyxb.com/EN/Y2013/V44/I3/366
21. Norris, B. J., & Whan, V. A. (2008). A gene duplication affecting expression of the ovine ASIP gene is responsible for white and black sheep. *Genome Research, 18*(8), 1282-1293. https://doi.org/10.1101/gr.072090.107
22. Peñagaricano, F., Zorrilla, P., Naya, H., Robello, C., & Urioste, J. I. (2012a). Gene expression analysis identifies new candidate genes associated with the development of black skin spots in Corriedale sheep. *Journal of Applied Genetics*, *53*, 99-106. https://doi.org/10/1997/s13353-011-0066-9
23. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research, 30*(9), e36-e36. https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36
24. Qin, H., Chen, Y., Wang, S., Ge, S., & Pang, Q. (2022). The role of KLF4 in melanogenesis and homeostasis in sheep melanocytes. *Acta Histochemica*, *124*(1), 151839. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151839
25. Royo, L. J., Alvarez, I., Arranz, J., Fernández, I., Rodríguez, A., Pérez-Pardal, L., & Goyache, F. (2008). Differences in the expression of the ASIP gene are involved in the recessive black coat colour pattern in sheep: Evidence from the rare Xalda sheep breed. *Animal Genetics*, *39*(3), 290-293. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01712.x
26. Saadat Nouri, M., & Siah Mansour, P. (1368). Principles of maintenance and raising sheep. Fourth edition, Tehran, Farhang Publications. Iran. (In Persian)
27. Searle, A. G. (1968). Comparative genetics of coat colour in mammals. *Comparative Genetics of Coat Colour in Mammals.* London, Logos Press Ltd.
28. Segre, J. A., Bauer, C., & Fuchs, E. (1999). Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nature Genetics*, *22*(4), 356-360.
29. Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S., & Wortsman, J. (2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological Reviews, 84*(4), 1155-1228. https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2003
30. Steingrímsson, E., Copeland, N. G., & Jenkins, N. A. (2006). Mouse coat color mutations: From fancy mice to functional genomics. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *235*(9), 2401-2411. https://doi.org/10.1002/dvdy.20840
31. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell, 131*(5), 861-872. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019
32. Traoré, A., Royo, L., Kaboré, A., Pérez-Pardal, L., Álvarez, I., Fernández, I., Sawadogo, L., Tamboura, H.H., & Goyache, F. (2012). Allelic and genotypic frequencies of ASIP and MC1R genes in four West African sheep populations. *African Journal of Biotechnology*, *11*(78), 14287-14291. https://doi.org/10.5897/AJB11.4031
33. Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W., & Hochedlinger, K. (2009). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *Journal of Cell Science, 122*(19), 3502-3510. https://doi.org/10.1242/jcs.054783
34. Våge, D. I., Klungland, H., Lu, D., & Cone, R. D. (1999). Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mammalian Genome*, *10*(1), 39-43. https://doi.org/10.1007/s003359900939
35. Wang, H., Xue, L., Li, Y., Zhao, B., Chen, T., Liu, Y., Chang, L., & Wang, J. (2016). Distribution and expression of SLC45A2 in the skin of sheep with different coat colors. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, *54*(3), 143-150. https://doi.org/10.5603/FHC.a2016.0015